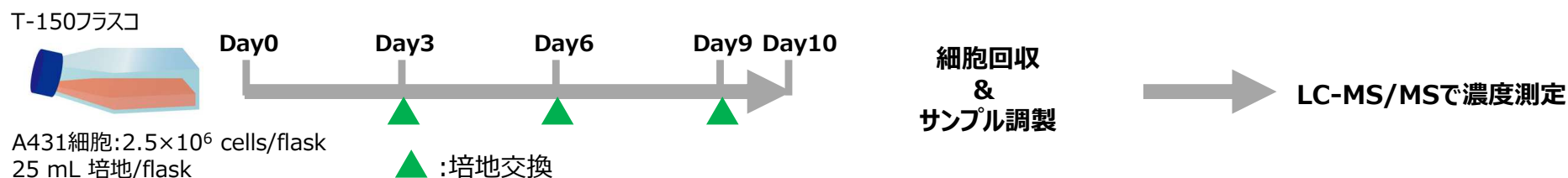


結論：

PG-001を10 ng/mLまたは1000 ng/mLの濃度で、10日間、細胞を培養した後、細胞内のPG-001の残留濃度を測定した結果、いずれの条件でも定量下限以下であった。

→ **PG-001は最終製品中に残存しないと考えられる。**

PG-001の細胞内残留性評価方法



培地組成

- DMEM, High Glucose, GlutaMAX, Pyruvate (Thermo)
- 10 % FBS (Thermo)
- 1X MEM NEAA溶液, 100X (Gibco)
- 1:1000 Gentamicin, 50 mg/ml (Nacalai)
- 0.01% DMSO
- **PG-001: 10 ng/mL (約 2.07 nM) または 1000 ng/mL (約 207 nM)**

サンプル調製ならびに測定方法

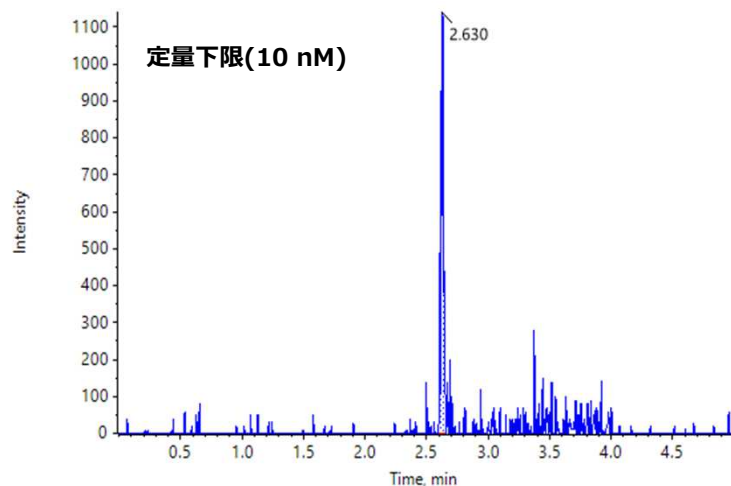
- 1) 回収した細胞を 1.0×10^6 cells/tube で分注
- 2) 凍結融解を2回繰り返すことで細胞破碎
- 3) 50 uLの抽出溶媒の添加によりPG-001を可溶化 (3%ギ酸/アセトニトリル, 20 nM Veparamil) →内部標準物質として添加
- 4) 15,000xg、10分間、4℃にて遠心分離
- 5) 上清を採取し、LC-MS/MSにて測定

検量線サンプルの作成方法

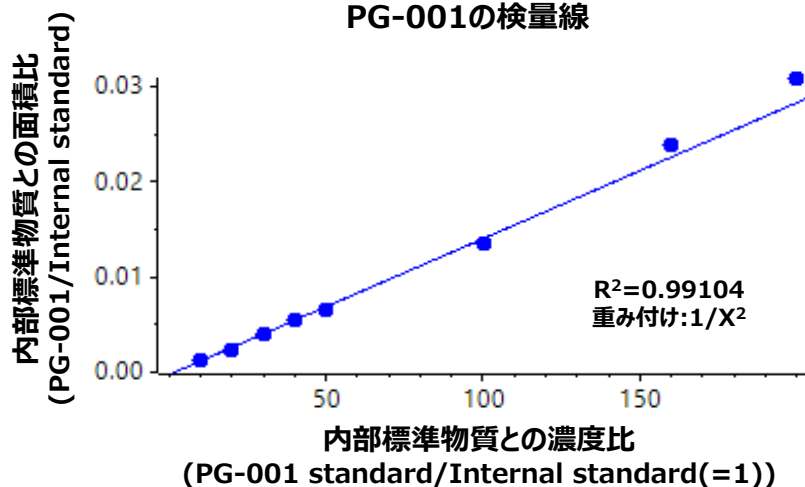
- 1) PG-001を含まない培地で培養したA431細胞を準備
- 2) 回収した細胞を 1.0×10^6 cells/tube で分注
- 3) 凍結融解を2回繰り返すことで細胞破碎
- 4) 異なる濃度のPG-001を含む抽出溶媒(内部標準物質含む)を50 uL添加。PG-001濃度: **0(ブランク), 10, 20, 30, 40, 50, 100, 160, 200 nM**
- 5) 15,000xg、10分間、4℃にて遠心分離
- 6) 上清を採取し、LC-MS/MSにて測定

残留性評価結果の詳細

PG-001のLC-MS/MSにおけるクロマトグラム例



PG-001の検量線



定量下限(LLOQ: lower limit of quantification)

10 nM → 2.35 ng (10 nM × 4705.29 g/mol × 50 μL)

LC-MS/MSの測定結果

10 ng/mL

Area:PG-001	Area: IS	測定濃度 (nM)
N/A	1335384	定量下限以下
91	1347377	定量下限以下
79	1349176	定量下限以下

1000 ng/mL

Area:PG-001	Area: IS	測定濃度 (nM)
54	1352723	定量下限以下
44	1359470	定量下限以下
54	1353460	定量下限以下

10 nM(定量下限のサンプル)

Area:PG-001	Area: IS	測定濃度 (nM)
1689	1310059	10.7 nM

✓ PG-001は細胞内に残留しない